

메리골드(*Tagetes L.*)와 카렌둘라(*Calendula officinalis L.*) 추출물이 인간 섬유아세포에서 콜라겐 생성 및 MMP-1 발현에 미치는 영향

박은선¹ · 김수미 · 문지선[†]

건국대학교 생물공학과¹, 경북대학교 약손피부미용과, 중원대학교 뷰티헬스학과[†]
(2017년 9월 26일 접수: 2017년 10월 17일 수정: 2017년 10월 28일 채택)

The Effects of Marigold(*Tagetes L.*) Extract and Calendula(*Calendula officinalis L.*) Extract on Collagen Growth and MMP-1 Expression in Human Dermal Fibroblasts

Eun-sun Park¹ · Su-mi Kim · Ji-sun Moon[†]

¹Department of Bioengineering, Konkuk University, 1, Hwayang-dong, Kwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea

Department of Yakson House Esthetic, Kyungbok University, Gyenggi-do, Namyangju-si, Gyeongbok dng 425, 12051, Korea

[†]Department of Beauty Health, Jungwon University, 85, Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 28024, Korea

(Received September 26, 2017; Revised October 17, 2017; Accepted October 28, 2017)

요약 : 카렌둘라 추출물과 혼용되어 불리고 있는 메리골드 추출물을 인간섬유아세포에서 콜라겐 생성과 MMP-1 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HDF세포를 이용하여 세포독성 및 콜라겐 생성과 MMP-1 발현을 측정하였다. 실험 결과, HDF세포에 대한 메리골드와 카렌둘라 추출물의 5 ~ 100 μ g/mL 농도에서 80%이상의 세포 생존율을 나타내어 세포독성이 없었으며, 콜라겐 합성능 측정 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 콜라겐 생성능의 증가를 나타냈으며, 메리골드 추출물 100 μ g/mL 농도에서 25%, 카렌둘라 추출물 100 μ g/mL 농도에서 7% 콜라겐 생성능의 증가를 확인하였다. MMP-1 발현에 미치는 영향 실험 결과, 메리골드와 카렌둘라 추출물 모두 MMP-1 발현을 억제시키는 것을 확인하였고, MMP-1 발현에 관련 있다고 알려진 p-JNK와 p-ERK의 인산화를 관찰한 결과, 메리골드 추출물은 p-JNK와 p-ERK 신호전달 경로를 통하여 MMP-1 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 메리골드 추출물의 주름 개선 효능을 확인하였고, 나아가 항노화 효능을 가지는 화장품 원료로 활용 가능성을 확인하였다.

주제어 : 메리골드, 카렌둘라, 항노화, 콜라겐, MMP-1

[†]Corresponding author
(E-mail: mjs@jwu.ac.kr)

Abstract : To research the effects of marigold extract, which is used mixed with calendula extract, on collagen growth and MMP-1 expression in human fibroblast, we measured cytotoxicity, collagen growth and MMP-1 expression by using HDF cells. The result of measurement showed over 80% cell survival rate in 5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration of marigold extract and calendula extract for HDF cells, which indicates there is no cytotoxicity. The result of measuring collagen synthetic abilities showed both types of extract had collagen synthetic ability increase dose dependently, by 25% in 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration of marigold extract, and by 7% in 100 $\mu\text{g/mL}$ concentration of calendula extract. The result of experimenting the effect on MMP-1 expression showed that both types of extract suppress MMP-1 expression. The result of observing phosphorylation of p-JNK and p-ERK, which are known to be involved with MMP-1 expression, revealed that marigold extract effectively suppresses MMP-1 expression through signaling pathway of p-JNK and p-ERK. The above results confirm the wrinkle improvement effect of marigold extract, and furthermore, it can be used as a cosmetic ingredient for anti-aging.

Keywords : Marigold, Calendula, Anti-aging, Collagen, MMP-1

1. 서론

피부의 주름과 탄력을 개선하고 진피층의 섬유아세포를 활성화시키는 식약의약품안전처 고시원료로 아데노신(adenosine), 레티놀(retinol), NAC(N-Acetyl Glucosamine) 등의 성분들이 있으며, 이들 성분을 함유한 제품들이 주름개선의 효과를 보이는 것으로 알려져 있다[1,2]. 섬유아세포는 진피층의 대표적 섬유상 단백질인 Collagen과 Elastin의 발현을 담당하고 Collagen은 신체 곳곳에 존재하는 대표적인 섬유상 단백질로서 14개의 type이 존재하며 이 중 피부에는 type I Collagen이 주로 존재한다[3]. 섬유아세포의 기능 이상은 Collagen 생성 저해 및 Collagen 분해 효소인 MMPs (matrix-metalloproteases)의 활성 증가로 이어지게 된다. 진피섬유아세포에서 발현된 MMPs는 진피층으로 분비되어 Collagen의 분해를 촉진하여 주름 생성과 탄력의 감소를 유도한다[4,5]. MMPs (matrix-metalloproteinase)는 피부의 섬유아세포(fibroblast)와 각질형성세포(keratinocyte) 등에서 분비되어 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 기저막(basement membrane, BM)을 구성하는 대부분의 기질단백질들을 분해하는 중요한 역할을 하고 있다[6].

메리골드는 국화과의 학명은 *Tagetes erecta L.*로 초롱꽃목, 국화과, 천수국속 식물로 황색, 등색, 등적색의 꽃을 피운다. 멕시코 원산으로 아프리카를 거쳐 유럽 퍼진 식물로 French marigold

(*Tagetes patula*) 만수국이라 부른다. 메리골드의 주요 성분은 루테인으로 알려져 있으며, 메리골드에 있는 총 카로티노이드의 90% 이상 루테인으로 구성되어 있다[7]. 메리골드 추출물은 염료 또는 향료로 사용되고, 피부의 염증 질환 및 살충제로 활용[8], 산화 억제 및 산화에 의해 유도된 세포 손상에 관한 방어[9] 작용이 있는 것으로 보고되었으며, 가금분야에서는 사료에 첨가 시 계육 및 난황의 착색을 개선시킬 수 있다는 연구 보고가 있다[10,11]. 카렌둘라의 학명은 *Calendula officinalis L.* 국화과 식물에 속하는 쌍떡잎 식물로 등적색, 황색, 등색의 꽃을 피우며 남부 유럽이 원산지인 꽃이다. 카렌둘라는 식품분야에 있어 염료 또는 향료, 의학 분야에서는 피부의 염증질환에 사용되며, 살충제로도 활용될 수 있으며[8], 항균효과(antimicrobial), 방부효과(antiseptic), 상처 및 궤양의 치료제, 혈압 강하제(hypotensive properties)로 활용될 수 있으며, 자가 산화(auto-oxidation)의 억제 및 산화에 의하여 유도된 세포 손상의 방어기능[9]으로 서양에서 민간요법(herbal remedy)으로 활용되어 왔다[12].

본 연구에서는 국화과 꽃 중 기능성 화장품 소재를 개발되고 있는 카렌둘라 추출물과 혼용되어 사용되고 있는 메리골드 추출물을 실험 소재로 선정하여, 자외선에 조사된 자외선 조사된 HDF(Human Dermal Fibroblast)에서 MMP-1 발현 변화와 Collagen 합성에 미치는 영향을 확

인하고자 한다.

2. 실험

2.1. 실험 재료

2.1.1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 시약은 NR solution, Griess reagent, NR solution, griess reagent, EZ-Cytox, ascorbic acid, PBS (phosphate buffered saline solution), DCF-DA (dichlorofluorescein diacetate), Dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA), Senescence detection kit(Biovision, USA), anti-MMP type I-Ab mouse Ig G, anti-mouse Ig G-Ab, primary antibody (β -actin primary antibody)를 Sigma-Aldrich (USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2.1.2. 재료 및 추출

본 연구에 사용된 메리골드는 2017년 5월 캐나다산으로 건조된 꽃 100 g를 H사이트 구입하였고, 카렌둘라는 2017년 6월 충북 진천에서 재배한 건조된 꽃 100 g을 농장에서 구입하여 실험 재료로 사용하였다. 시료의 추출은 70% 에탄올과 증류수를 시료 무게의 10배를 가하여 실온에서 72시간 방치하였다. 72시간 후 얻어진 추출물의 상층액을 정제 후, 추출액만을 분리하기 위하여 원심분리(FinePCR, Korea)하고, 여과지(Whatman[®]No.2filter papers; GE Healthcare Life Sciences, UK)를 이용하여 여과한 후 추출용매인 에탄올을 제거하기 위하여 감압농축기(Korea Bio-Tech Co., Ltd, Eyela)를 통해 에탄올과 증류수를 제거한 뒤 동결 건조(FDU-8606, Operaon Gimpo, Korea)하여 최종 추출물을 얻어 본 실험에 사용하였다.

2.1.3. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 HDF(Human Dermal Fibroblast)세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Hyclone, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)와 1% penicillin/

streptomycin (100 IU/ 50 μ g/mL, Sigma-Aldrich)이 첨가하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 습윤 배양기(Jeio Tech, Korea)에서 배양하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. NR assay를 이용한 세포 생존율 측정

메리골드와 카렌둘라 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 분석 및 측정하였다[13]. HDF 세포를 96 well plate에 당 3×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 24시간 배양 후 잣나무 잎 추출물을 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 희석하여 각 well plate에 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 48시간 후 무혈청 배지에 1% NR solution (Sigma-Aldrich, USA) 용액이 첨가된 배양액으로 교환하여, 3시간 동안 배양한 후 Phosphate buffered saline (PBS; Sigma-Aldrich, USA)에 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA)용액을 첨가하여 각 well에 100 μ L씩 분주하여 20분 동안 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid (Sigma-Aldrich, USA), 49% ethanol (Duksan, Korea), 50% distilled water)을 각 well에 100 μ L씩 분주하여 세포 내의 NR을 추출한 다음 microplate reader (Synergy HT, BioTek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 실험의 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(%)=

$$\frac{\text{시료첨가군의 흡광도}(540 \text{ nm})}{\text{시료무첨가군의 흡광도}(540 \text{ nm})} \times 100$$

2.2.2. MMP-1 발현 억제능

메리골드와 카렌둘라 추출물이 MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)방법으로 MMP-1 발현 억제능 측정을 수행하였다. HDF 세포를 96 well plate에 3×10^4 cell/well 농도로 분주하여 세포가 바닥에 부착할 수 있도록 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 well plate 상층액을 제거하고 시료를 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도별로

처리하여 UVB를 100 mJ/cm²로 20분 조사 후 MMP-1을 발현을 측정하기 위해 24시간 배양하였다. 배양 상층액 100 mL를 새로운 96 well plate에 옮긴 후 coating buffer 100 mL를 첨가한 후 overnight 시킨다. 배양 상층액을 제거한 후 PBS-T (PBS, 0.05% Tween-20 함유) 200 mL로 3회 washing을 하고 blocking buffer (PBS, 0.1% BSA 함유) 100 mL씩 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Blocking 후 PBS-T 200 mL로 3회 washing을 하고 blocking solution으로 1000배 희석한 primary antibody (anti-MMP-1 mouse antibody)를 50 mL씩 처리 후 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. PBS-T 200 mL로 3회 washing 후 alkaline phosphatase가 결합된 secondary antibody (anti-mouse IgG antibody)를 blocking solution으로 4000배 희석을 한 후 각 well에 50 mL씩 처리 후 37°C에서 1시간 동안 방치하였다. 마지막으로 PBS-T 200 mL로 3회 washing하고 substrate인 발색시약 p-nitrophenyl phosphate (9.7% diethanolamine buffer, 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8)를 각 well에 200 mL씩 첨가한 후 new plate에 aluminium foil로 감싼 뒤 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 microplate reader를 이용하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다. MMP-1 발현 억제율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{MMP-1 발현 억제율(\%)} = 100 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도(405 nm)}}{\text{시료무첨가군의 흡광도(405 nm)}} \times 100$$

2.2.3. Collagen 합성능

메리골드와 카렌둘라 추출물이 Collagen 합성능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. HDF세포를 well당 1 × 10⁴ 씩 분주하여, Overnight 시킨 후 well의 상층액을 제거하여 메리골드 추출물과 카렌둘라 추출물을 각각 5, 10, 20, 50, 100 μg/mL 농도로 처리 후 48시간동안 배양한다. 배양 상층액 50 μL를 Maxisorb 96well plate에 옮긴 후 Coating buffer 100 μL를 첨가한 후 Overnight 시킨다. 배양 상층액 제거 후 Washing buffer 200 μL로 3회 washing (Tween20 in PBS)한다. Blocking buffer(0.1% BSA in PBS) 100 μL처리 후 37°C에서 1시간 정지한다. 배양 상층액 제거

후 Washing buffer 200 μL로 3회 washing (Tween20 in PBS)한다. 1000배 희석한 Primary antibody(Anti-collagen type I-Ab mouse IgG)를 100 μL씩 처리 후 37°C에서 1시간 정지한다. 배양 상층액 제거 후 Washing buffer 200 μL로 3회 washing (Tween20 in PBS)하여, 4000배 희석한 Second antibody(Anti-mouse IgG-Ab - Alkaline phosphatase)를 100 μL씩 처리 후 37°C에서 1시간 정지한다. 배양 상층액 제거 후 Washing buffer 200 μL로 3회 washing (Tween20 in PBS)하고, 1 mg/mL의 농도로 녹인 p-Nitrophenyl phosphate(in 9.7% diethanolamine buffer) 200 μL를 각 well당 처리 후 37°C 암실에서 1시간 정지 후 405 nm 흡광도에서 측정하였다.

2.2.4. Western blotting

메리골드가 HDF 세포내 MMP-1 생성에 중요하게 작용하는 kinase인 ERK(extracellular-signalregulated kinases)와 JNK(c-Jun N-terminal kinases)의 세포내 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 western blot analysis를 실시하였다. HDF 세포를 1.5 × 10⁵cells/well의 농도로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 HDF 세포에 α-MSH 100 mM이 처리된 DMEM 배지에 HDF 세포에 시료 25, 50 μg/mL 농도로 처리한 다음 48시간 배양한 세포를 수확하여 PBS로 세척 후 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer [50 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5), 50 mM sodium chloride (NaCl), 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate (C₂₄H₃₉NaO₄), 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), protease inhibitor cocktail; Roche, Switzerland]로 첨가하여 세포를 용해한 후 상층액을 회수하였다. 단백질을 변성시키기 위하여 SDS buffer[14.4 mM 2-mercaptoethanol, 60 mM Tris (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue]를 첨가한 후 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용하여 단백질을 분자량별로 분리하였다. 분리된 단백질은 100 V의 조건에서 nitrocellulose membrane (Whatman, GE Healthcare Life Sciences, UK)으로 transfer한 다음 membrane에 옮겨진 단백질을 5% skin milk 용액에서 blocking 한 후 1 × tris-buffered saline with tween 20 [TBST; 150

mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (0.2% Tween 20, pH 7.5)]에 희석한 β -actin primary antibody, anti-MITF antibody produced in rabbit, anti-tyrosinase antibody produced in mouse를 처리하고 24시간 동안 교반하였다. Secondary antibody는 anti-mouse IgG antibody, anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하여 30분 교반하였으며, 교반이 완료된 membrane은 mixture of tris-buffered saline (TBS) and Tween 20 (TBST; 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl)로 세척하였다. 세척이 완료된 후 실험용 필름(Konica Minolta, Japan)에서 SuperSignal[®]WestPicoChemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA)을 처리하여 필름에 감광을 유도한 다음 암실에서 자동현상기(QX-130II, Konica Minolta)를 이용하여 현상하였다. 현상된 필름상의 단백질 양은 ImageJ (National Institutes of Health, USA)를 이용하여 band 농도차이를 비교하였다.

2.2.5. 통계처리

본 실험의 연구 결과는 평균 \pm 표준편차(mean \pm standard deviation, M \pm SD)로 표기하였으며, 통계 처리는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) window version 17.0 (IBM, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 검증은 Student's t-test를 실시하였고, p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다. 모든 실험은 동일한 조건하에 독립적으로 3회 이상 실시하여 실험 결과를 얻어 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 세포 생존율 측정 결과

3.1.1. Human dermal fibroblast(HDF)세포에 대한 세포 생존율

본 연구에 사용한 인간 섬유 세포인 HDF 세포에서 메리골드와 카렌둘라 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 70%에탄올을 이용한 메리골드와 카렌둘라 추출물 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하고, 48시간 배양하여 NR assay를 실시하였다.

실험 결과 메리골드 추출물의 경우 5, 10, 20,

50, 100 μ g/mL 농도로 증가함에 따라 세포가 증식율이 증가함을 나타냈으며, 카렌둘라 추출물의 경우 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL 농도까지 100%보다 높은 세포생존율을 나타냈다. 메리골드와 카렌둘라 추출물 100 μ g/mL 농도일 때, 세포 생존율이 메리골드 추출물은 119%, 카렌둘라 추출물은 101%로 세포 독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다.(Fig. 1.).

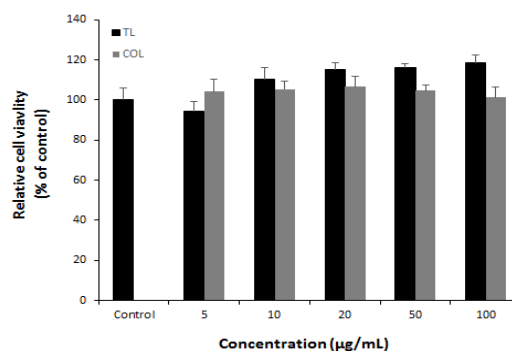


Fig. 1. Effect of *Tagetes L.* and *Calendula officinalis L.* extract on cell viability in HDF cells.

TL: *Tagetes L.*, COL: *Calendula officinalis L.* 70% ethanol extract.

3.2. 메리골드 추출물의 항노화 효과 측정 결과

3.2.1. Collagen 합성능 측정

피부는 표피, 진피, 피하조직으로 구성되며, 이 중 진피는 섬유성분, 기질성분으로 구성되어 있고 섬유성분으로 존재하는 콜라겐은 진피의 90%를 차지하는 주요 단백질이다. 시료의 HDF 세포에 대한 메리골드와 카렌둘라 추출물의 콜라겐 생성 합성능 변화를 관찰하기 위하여 각각의 추출물을 HDF 세포에 48시간 동안 처리한 후 배양 상층액을 취하여 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)방법으로 분비된 콜라겐의 함량을 측정하였다. 실험결과(Fig. 2), 시료 처리를 하지 않은 Negative control에 비하여 메리골드 추출물과 카렌둘라 추출물에서 모두 콜라겐 생성이 촉진됨을 확인할 수 있었다. 두 추출물 모두 농도 의존적으로 콜라겐 생성능의 증가를 보였으며, 메리골드 추출물의 경우 100 μ g/mL 농도에서 25%, 카렌둘라 추출물의 경우 100 μ g/mL 농도에서 7% 콜라겐 생성능의 증가를 보

였다. 이와 같은 메리골드 추출물의 결과는 앞서 본 세포 생존률 결과에서 세포 증식 효과와 콜라겐 생성 촉진능의 효과는 사이토카인이 다량 분비하여 효과를 나타내었음을 짐작할 수 있는 결과이다. 이와 같은 결과는 메리골드 추출물과 카렌둘라 추출물의 콜라겐 생성 촉진 효과를 확인한 것으로 이를 첨가한 화장품 개발 등의 기능성 화장품 소재로서의 적용 가능성이 있다고 사료된다.

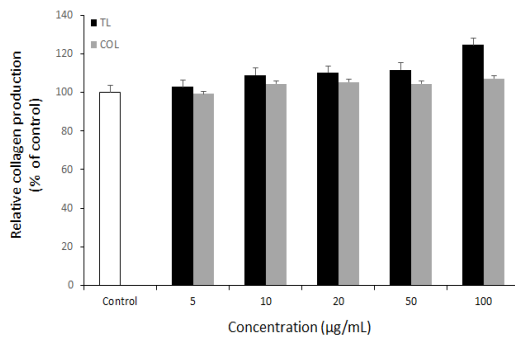


Fig. 2. Collagen Biosynthesis of *Tagetes L.* and *Calendula officinalis L.* extract in HDF cells.
TL: *Tagetes L.*, COL: *Calendula officinalis L.* 70% ethanol extract.

3.2.2. MMP-1 발현 억제능 측정

MMPs(matrix-metalloproteinase)는 세포의 기질은 분해시키는 중요한 단백질이다. 과도하게 활성화되면 MMPs의 활성을 억제하는 TIMPs(tissue inhibitor of MMPs)가 발현되어 서로 상호작용에 의해 조절되고 있다[14]. HDF 세포에 대한 메리골드 추출물의 주름개선 효능을 확인하기 위하여 주름생성에 직접적으로 관여하는 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 발현 저해효능을 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)방법으로 측정하였다. HDF 세포에 24시간 동안 처리한 후 배양 상층액을 취하여 분비된 MMP-1의 함량을 측정하였다. 실험결과(Fig. 3.), HDF 세포에 70% 에탄올로 추출한 메리골드 추출물과 카렌둘라 추출물을 5, 10, 20, 50, 100 µg/mL 농도로 처리한 후 UVB lamp를 이용하여 100 mJ/cm² 20분 조사하였다. 실험 결과 메리골드 추출물의 경우 MMP-1 발현율이 79%, 63%, 53%, 50%, 42%로 농도 의존적으로

MMP-1 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 카렌둘라 추출물 또한 MMP-1 발현율이 농도 의존적으로 MMP-1 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있다. 메리골드 추출물과 카렌둘라 추출물의 MMP-1 발현 억제율을 비교해봤을 때, 농도가 100 µg/mL에서 메리골드 추출물의 경우 58%로 카렌둘라 추출물의 억제율인 28%보다 2 배정도 MMP-1의 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있고 Control군과 거의 비슷한 수준까지 억제율을 가지고 있는 것을 확인하였다. 결과적으로 메리골드와 카렌둘라 추출물은 MMP-1 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인하였고, 메리골드 추출물은 주름생성을 지연시키는 역할을 하는 기능성 화장품 소재로서의 큰 효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

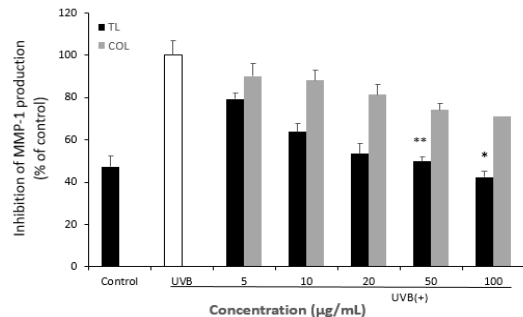


Fig. 3. Inhibitory effects of *Tagetes L.* and *Calendula officinalis L.* extract on UVB-induced secretion of MMP-1 in HDF cells.
TL: *Tagetes L.*, COL: *Calendula officinalis L.* 70% ethanol extract.

3.2.3. MMP-1 유전자 발현에 관련된 세포 신호전달 경로

[15, 16]의 연구에 따르면 HDF세포에 UV가 조사되면 세포내 DNA가 손상될 뿐만 아니라 광노화 현상이 발생하고, HDF의 광노화는 세포의 성장 저해 및 MMP 발현을 증가시키며, 진피층에 존재하는 콜라겐 분해를 촉진 시킨다. 따라서 증가된 MMP는 콜라겐의 분해를 촉진하여 주름 생성과 탄력감소를 유도한다[17]. 본 연구에서는 UVB에 의한 MMP-1 유전자 발현에 관련 있다고 알려진 p-JNK와 p-ERK의 인산화 정도를 Western blotting를 이용하여 측정하였다. 메리골드 추출물은 UVB에 의해 유도된 p-JNK와

p-ERK의 인산화를 억제함으로써 MMP-1 유전자의 발현을 억제할 수 있다는 것을 시사한다. 메리골드 추출물을 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 후 UVB lamp를 이용하여 100 mJ/cm^2 의 강도로 조사하였다. 실험 결과(Fig. 4), UVB 조사 후 p-JNK와 p-ERK의 유의적으로 인산화가 증가된 것을 확인할 수 있었고, p-JNK와 p-ERK 모두 농도가 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가함에 따라 p-JNK 인산화의 억제율은 25%, 49%로 증가했고, p-ERK 인산화의 억제율은 18%, 44%로 증가하는 것을 통하여 MMP-1 유전자의 발현을 억제시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 메리골드 추출물이 HDF 세포에서 UVB에 의해 유도된 p-JNK와 p-ERK의 인산화를 억제함으로써 MMP-1 유전자의 발현을 억제할 수 있다는 것으로 사료된다.

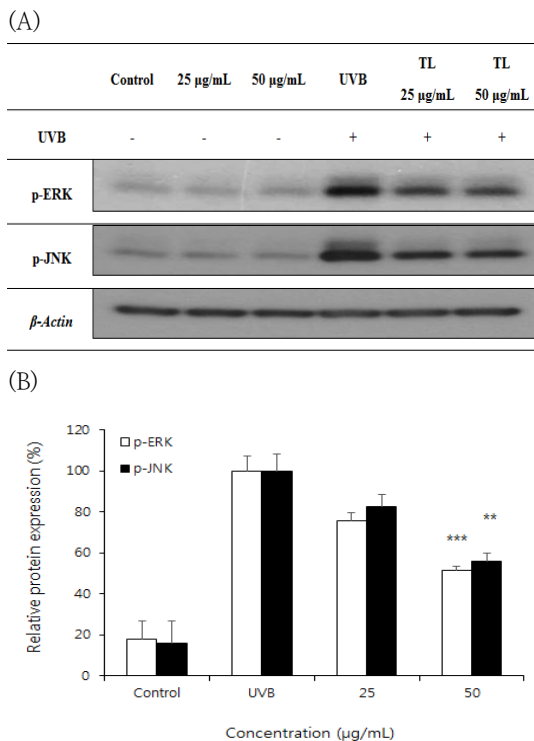


Fig. 4. Inhibitory effects of *Tagetes L.* extract on UVB-induced activation of p-JNK and p-ERK in HDF cells.

TL: *Tagetes L.* 70% ethanol extract.
(A): Image, (B): Graph

4. 결론

본 연구에서는 메리골드(*Tagetes L.*)와 카렌둘라(*Calendula officinalis L.*) 추출물이 인간 섬유아세포에서 콜라겐 생성 및 MMP-1 발현에 미치는 영향에 대한 주름 개선 효능 및 항노화 효능을 가지는 화장품 원료로 활용 가능성을 검토하고자 하였다. 메리골드(*Tagetes L.*)와 카렌둘라(*Calendula officinalis L.*) 추출물의 실험 결과는 다음과 같다.

1. 항산화 효과를 확인하기 위해 총 폴리페놀, 총 플라보노이드를 측정할 결과, 메리골드와 카렌둘라 추출물에서 모두 농도 의존적으로 효과가 증가하는 것으로 나타났고, 카렌둘라 추출물보다 메리골드 추출물이 항산화능이 더 우수하였다.
2. HDF 세포의 세포 생존율 및 세포독성을 확인한 결과, 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성이 나타나지 않았으며, 높은 생존율을 확인하였다.
3. HDF 세포에 콜라겐 생성 합성능 변화를 실험한 결과, 두 추출물 모두 농도 의존적으로 콜라겐 생성능의 증가를 보였으며, 메리골드 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 25%, 카렌둘라 추출물의 경우 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 7% 콜라겐 생성능의 증가하였다.
4. 메리골드와 카렌둘라 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향을 실험한 결과, 메리골드와 카렌둘라 추출물 모두 MMP-1 발현을 억제시키는 것을 확인하였으며, 또한 메리골드 추출물은 MMP-1 발현을 억제시키는 효과가 UVB를 처리하지 않은 Control군의 MMP-1 발현수준만큼 효과가 있었음을 확인하였다.
5. MMP-1 발현에 관련 있다고 알려진 p-JNK와 p-ERK의 인산화를 관찰한 결과, 메리골드 추출물은 p-JNK와 p-ERK 신호 전달 경로를 통하여 MMP-1 발현을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

본 연구 결과, 항산화 및 콜라겐 생성, MMP-1 발현 모두 카렌둘라 보다 메리골드 추출물이 더 높은 효과를 나타내는 결과를 확인하

였고, 주름 개선 효능 및 항노화 효능을 가지는 기능성 화장품 원료로 사용하는 것을 제안하며, 향후 임상적 활용 가능성을 판단하기 위해 인체 시험을 통한 메리골드 추출물의 효능 검증 추가 연구 및 임상연구가 필요할 것으로 보인다.

References

1. Chan ES, Fernandez P, Merchant AA, Montesinos MC, Trzaska S, Desai A, Tung CF, Khoa DN, Pillinger MH, Reiss AB. "Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma", *Arthritis & Rheumatology*, vol. 54, pp. 2632-2642, (2006).
2. Sorg O, Antille C, Kaya G, Saurat JH. "Retinoids in cosmeceuticals", *Dermatologic Therapy*, vol.19, pp. 289-296, (2006).
3. Uitto J, Olsen DR, Fazio MJ. "Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 92, pp. 61-77, (1989).
4. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. "Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism", *Nature*, vol. 379, pp. 335-339, (1996).
5. Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ. "Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 120, pp. 835-841, (2003).
6. Netzel S, Mitola DJ, Yanada SS, Holmbeck K. "Collagen dissolution by keratinocytes requires cell surface plasminogen activation are matrix metalloproteinase activity", *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 451-454, (2002).
7. Quackenbush FW, Miller SL. "Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals", *J. Assoc. Off Anal Chem.*, vol. 55, pp. 617-621, (1972).
8. Khan MT, Potter M, Birch I. "Podiatric treatment of hyperkeratotic plantar lesions with marigold *Tagetes erecta*", *Phytother Res.*, vol. 10, pp. 211-214, (1996).
9. Zitterl-Eglseer K, Sosa S, Jurenitsch S, Schubert-Zsilavec J, Loggia M, Tubaro R, Bertoldi A, Franz M. "Anti-oedematous activities of the main triterpentiol esters of mari-gold(*C. officinalis* L.)", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 57, pp. 139-144, (1997).
10. Hadden WL, Watkins RH, Levy LW, Regalado E, Rivadeneira DM, van Breemen RB, Schwartz SJ. "Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement", *J. Agric Food Chem.*, vol. 47, pp. 4189-4194, (1999).
11. Karadas F, Grammenidis E, Surai PF, Acamovic T, Sparks. "NHC Effects of carotenoids from lucerne, marigold and tomato on egg yolk pigmentation and carotenoid composition", *Br. Poult Sci.*, vol. 47, pp. 561-566, (2006).
12. Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. "Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers", *Biomed. Pharmacother.* vol. 51, pp. 176-180, (1997).
13. Borenfreund E, Puerner JA, "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption", *Toxicol. Lett.*, vol. 24, pp. 119, (1985).
14. Choi YA. "Signaling pathway of MMP-2 in fibroblast migration and chondrogenic differentiation", Department of Biology kyungpook University, (2007).
15. Kim J, Lee CW, Kim EK, Lee SJ, Park NH, Kim HS, Kim HK, Char K, Jang YP, Kim JW. "Inhibition effect of *Gynura procumbens* extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts", *J. Ethnopharmacol.*, vol. 137, pp. 427-433, (2011).

16. Yoon YM. Anti-photoaging effects of silibinin on human dermal fibroblasts, Department of Bioengineering Konkuk University, (2012).
17. Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ. "Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo", *J. Invest. Dermatol.*, vol. 120, pp. 835-841, (2003).